

⑤ Int.Cl.⁴

C 07 F 9/09

識別記号

庁内整理番号

G-6917-4H

④ 公開 昭和62年(1987)11月10日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑬ 発明の名称 新規ホスホリルコリン誘導体の製造法

⑮ 特 願 昭61-101172

⑯ 出 願 昭61(1986)5月2日

⑰ 発 明 者 ワイ・シー・リー 東京都板橋区小豆沢3-6-10 オリエンタル酵母工業株式会社内

⑱ 発 明 者 川 口 吉 太 郎 神戸市垂水区桃山台6-12-7

⑲ 発 明 者 西 河 淳 箕面市牧落1-14-11

⑳ 発 明 者 高 河 原 勇 川西市大和東5-7-13

㉑ 出 願 人 オリエンタル酵母工業株式会社 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号

㉒ 出 願 人 国際試薬株式会社 神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

㉓ 代 理 人 弁理士 戸田 親男

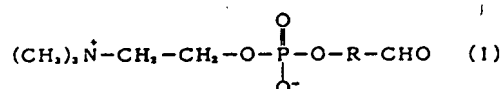
明 細 書

1. 発明の名称

新規ホスホリルコリン誘導体の製造法

2. 特許請求の範囲

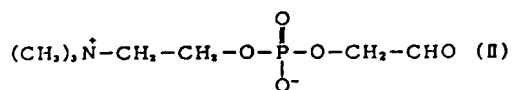
1. 次の式(I)に示される化合物と、



(式中Rは炭素を骨格とした構造を有する)

分子内にアミノ基をもった高分子化合物とを、還元アミノ化反応せしめることを特徴とする新規ホスホリルコリン誘導体の製造法。

2. 式(I)に示される化合物が次の式(II)に示されるコリンホスホリルグリコアルデヒドである特許請求の範囲第1項記載の新規ホスホリルコリン誘導体の製造法。



3. 分子内にアミノ基をもった高分子化合物がア

ルブミンである特許請求の範囲第1項記載の新規ホスホリルコリン誘導体の製造法。

4. 式(I)に示される化合物が、式(II)に示されるコリンホスホリルグリコアルデヒドであり、かつ分子内にアミノ基をもった高分子化合物がアルブミンである特許請求の範囲第1項記載の新規ホスホリルコリン誘導体の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、分子内にアミノ基をもつ高分子化合物からなる担体にホスホリルコリンの誘導体を選元アミノ化反応を利用して固定化する新規ホスホリルコリン誘導体の製造法に関するものである。

(産業上の利用分野)

一般に、C-反応性蛋白質(C-reactive protein、以下CRPという)は肺炎双球菌のC多糖と反応する蛋白質として知られ広く細菌感染の際血中に現れる。

そこで、体液、特に血中のCRPの濃度の測定は、組織破壊を伴うような細菌による炎症性疾患の診断に有用な情報を提供するものであり、又、

悪性しゅようの早期診断にもつながることから、現在臨床検査領域において広く用いられるようになってきている。

そして、その定量法は抗原抗体反応を利用して行なわれるのが一般的であるが、この定量法で用いる抗体を作製する場合には、高純度のCRPが必要であり、又、検量線を得るための正確なCRP濃度の標準液も必要である。この標準液は一般に高純度のCRPをCRPを含まない血清に加えて作製するため、やはり高純度のCRPが必要である。

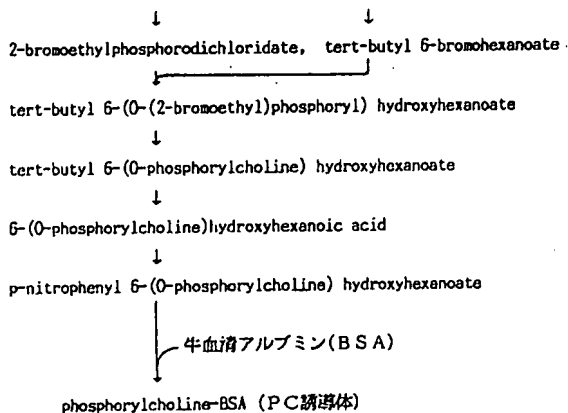
CRPの単離方法としては、Woodらの方法(Wood, H.V., et al. (1954) J. Exp. Med., 10, 71)やPepysらの方法(Pepys, M. B., (1977) Lancet, 1, 1029)が知られているが、いずれの方法も夾雑蛋白質の混入を防ぐことが出来ず、高純度のCRP標品を単離・精製することが困難である。その他の精製法として、CRPはカルシウム存在下でホスホリルコリン(Phosphorylcholine, 以下、PCと略記することもある)と特異的に結

合するという知見より、PCをリガンドとして固定化した高分子担体(以下、PC-固定化担体と略記することもある)のアフィニティークロマトグラフィーによってCRPを単離する方法も提案されている(Oliveira, E. B. et al. (1980) J. Immunol., 124, 1396.)。これらのPC-固定化担体によるCRPの精製法には、精製工程の簡略化と、夾雑蛋白質の混入を防止し、高純度のCRPを得ることが出来るという利点がある。しかし、従来のこれらのPC-固定化担体の製造法は、非常に複雑で反応ステップも多いことから多大の労力が必要とされ、最終生成物の収量も低いという問題点がある。

そこで、本発明者らは、精製工程が簡略化され高純度のCRPを得ることが出来るアフィニティークロマトグラフィーのPC-固定化担体の製造において、上記の問題点を解決すべく鋭意検討した結果、市販の物質・試薬等を用いて容易にPC-固定化担体を製造出来る方法を開発することに成功し、本発明を完成した。

(従来技術との比較)

従来のPC-固定化担体の製造法は、先にも述べたように非常に反応ステップが多く複雑な合成反応を必要としている。下記にOliveira, E.BらのPC-固定化担体の製造法の一例を示す。(尚、矢印は一つの反応ステップを意味する)

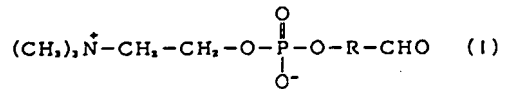


上記のように従来法では、多くの反応ステップを必要とするため、必然的に多大の労力を要し、

操作も複雑であり、収率も低い。

しかし、本発明におけるPC-誘導体の製造法は例えば市販のL-グリセロホスホリルコリンを過ヨウ素酸で酸化し、その生成物の高分子担体への固定化も還元アミノ化反応という一つの反応ステップだけで製造することが出来るため、従来法にくらべ非常に容易にかつ高収率で製造することが可能となったのである。

本発明は次の式(1)に示される化合物と、



(式中Rは炭素を骨格とした構造を有する。)

分子内にアミノ基をもった高分子化合物とを、還元アミノ化反応せしめることを特徴とする新規ホスホリルコリン誘導体の製造法である。

式(1)で示される化合物はその前駆的化合物、即ちL-グリセロホスホリルコリン、D-グリセロホスホリルコリンなどを過ヨウ素酸で酸化すれば容易に得ることができる。

また、本発明の反応に用いる分子内にアミノ基をもった高分子化合物としては、各種の蛋白質があるが、市販の牛血清アルブミンを使用するのが好ましい。

反応は式(1)で示される化合物と緩衝液中で還元アミノ化反応を行なえばよい。還元剤としては、ジメチルアミンボラン、シアノ水素化ほう素ナトリウムなどがあるが、シアノ水素化ほう素ナトリウムが一般的である。反応は37℃程度に加温し、10～30時間の反応によって、高分子化合物のアミノ基に式(1)の化合物が結合する。

反応後は、水に対して透析し、未反応低分子化合物を除去し、透析内液を凍結乾燥し、ホスホリルコリン誘導体(PC-誘導体)を粉末で得ることができる。

本発明の製造法で合成されたPC-誘導体はCRPの精製に用いて高純度のCRPを容易に製造せしめるだけでなく、CRPの定量にも利用することができる。

現在、体液中のCRPの定量には、毛細管法、

S R I D法(一次元免疫拡散法)、ラテックス凝集反応等の半定量法、免疫比濁法、レーザーネフエトメトリー法等の定量法等があるが、これらはすべてCRPの抗原抗体反応が利用されている。PCは、CRPの抗体ではないが、CRPに対して、CRPの抗体に勝るとも劣らない特異性ならびに結合力を有するものであり、本発明の製造法で製造されたPC-誘導体も又、CRPに対して同様の性質を有するものであり、CRPの抗体の代りに使用することができる。

次に本発明の実施例を示す。

実施例 1.

50mMのL-グリセロホスホリルコリン水溶液52mlにメタ過ヨウ素酸ナトリウムを終濃度100mMとなるように溶解し、室温で30分間放置することにより、コリンホスホリルグリコアルデヒドとホルムアルデヒドの混合生成物を得た。次に、この混合生成物を氷浴中で2時間冷却し、加えた過ヨウ素酸と等モル量のエチレングリコールを加え乾固した。得られた白色の粉末を0.1 Mの酢酸10mlに溶

解し0.1M酢酸であらかじめ平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシア社製)カラムでゲルロカを行なった。ネオカプロイン法で確認したコリンホスホリルグリコアルデヒド溶出画分を集め濃縮した。分子内リン酸残基を定量することによってコリンホスホリルグリコアルデヒドのL-グリセロホスホリルコリンよりの収率を求めたところ80%であった。

上記のようにして得られたコリンホスホリルグリコアルデヒド 470mgを0.2 Mリン酸緩衝液pH7.0の溶液70mlに溶解し、さらに牛血清アルブミン(BSA)を800mg加えた。次に、シアノ水素化ほう素ナトリウム 870mgを加え、37℃で20時間、インキュベートした。インキュベート後、反応液を水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥することによりBSA 1分子あたり平均24.3分子のPCが結合した新規PC誘導体を得た。

実施例 2.

40mgのBSAと、第1表の番号1～4に示すそれぞれの量の実施例1で示した方法と同様にして

合成したホスホリルコリングリコアルデヒド、シアノ水素化ほう素ナトリウム、0.2Mリン酸緩衝液pH7.0を使用して実施例1と同様の操作を行なった。

第 1 表

試薬名 ＼ 番号	BSA (mg)	ホスホリルコリン グリコアルデヒド (mg)	シアノ水素化ほう 素ナトリウム (mg)	0.2Mリン酸 緩衝液 pH7.0 (ml)
1	40	2.02	14.2	3.5
2	40	4.32	14.4	3.5
3	40	67.5	67.7	3.5
4	40	108	90.3	4.1

以上のようにして製造された新規 P C 誘導体は
 B S A 1 分子あたり、番号 1 が 3.9 分子、2 が 7.9
 分子、3 が 49.4 分子、4 が 56.3 分子の P C を結合
 していることがわかった。

代理人 井理士 戸 田 親 男

PTO 07-4203

Japan Kokai
62-258390

PRODUCTION METHOD OF NOVEL PHOSPHORYL CHOLINE PHOSPHOR
INDUCTOR

(Shinki hosuhorirukorin yudotai no seizo ho)

Wai shi- Rii et al

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington D.C. May 2007

Translated by Schreiber Translations, Inc.

<u>Country</u>	:	Japan
<u>Document No.</u>	:	62-258390
<u>Document Type</u>	:	Kokai
<u>Language</u>	:	Japanese
<u>Inventor</u>	:	Wai shi- Rii - et al
<u>Applicant</u>	:	International Pharmaceutical Co.
<u>IPC</u>	:	C 07 F 9/09
<u>Application Date</u>	:	May 2, 1986
<u>Publication Date</u>	:	November 10, 1987
<u>Foreign Language Title</u>	:	Shinki hosuhoriyl korin yudo tai no seizo ho
<u>English Title</u>	:	Novel phosphoryl choline inductor production method

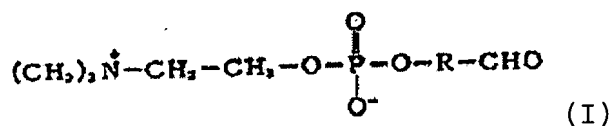
Specification

1. Title of Invention

Novel phosphoryl choline inductor production method

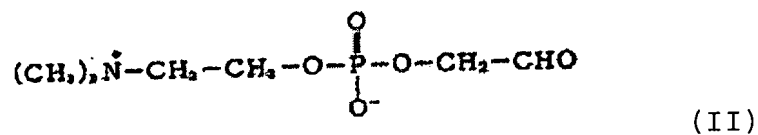
2. Scope of Patent Claims

1. The new phosphoryl choline inductor production method is characterized in that a polymer compound having an amino group in the molecule is reacted with a reduction amino reaction, this compound is represented with the next formula (I):



(R in the formula has a structure that oxygen is in the frame)

2. The new phosphoryl choline inductor production method as stated in Claim 1 of the Scope of Patent Claim is characterized in that the compound shown in formula (I) is the choline phosphoryl glycol aldehyde which is shown with the next formula (II).



¹ the numbers in the margin indicate pagination in foreign text

3. The polymer compound having the amino group in the molecule in the production method of the new phosphoryl choline inductor of Claim 1 in the Scope of Patent Claims is albumin.

4. The compound shown in formula (I) in Claim 1 of the Scope of Patent Claims is the phosphoryl choline glycol aldehyde shown in formula (II) and the polymer compound having the amino group in the molecule is albumin.

3. Detailed explanation of the invention

The invention pertains to the production method of a new phosphoryl choline inductor where it is solidified by using the reduction amino reaction of the inductor of the phosphoryl choline in the carrier that is made from a polymer compound having the amino group inside the molecule.

(Industrial field of use)

In general, the C - reactive protein (C-reactive protein known below as CRP) is seen in the blood during a cell infection, it is widely known as the protein that is reactive with the C sugar during the inflammation of the cells.

Therefore, the measurement for the concentration of the CRP in the body fluid, in particular, in the blood is the offer of information for diagnosing the inflammation

caused by the infection that accompanies the tissue breakdown. Also, it is widely used in the present clinical examination region since early diagnosis of the ailment is possible. /2

Then, that quantitative method is used in general in the immune reaction but when the antibody is made using this quantitative method, highly pure CRP is required. Also, it is necessary to obtain the standard fluid for the correct CRP concentration to obtain the correct diagnosis. To produce this standard fluid, highly pure CRP is added to the blood serum that does not contain CRP. Thus, highly pure CRP is required for this method.

An example of the separation method for the CRP that is known is the method by Wood et al method (Wood, H.V, et al (1954) J. Exp. Med., 10, 71) and Pepys et al method (Pepys, M.B., (1977) Lancet, 1, 1029), in any of these methods, the mixing in of the impure protein cannot be prevented so it is difficult to purify and separate the CRP product with high purity. Another production method that is known is the bonding specifically of the phosphoryl choline (Phosphorylcholine is referred to below as PC) under the presence of calcium. A method was offered for separating the CRP by the affinity chromatography of the polymer carrier (refer to below as the PC - solidified carrier),

the PC is solidified as the ligand (Oliveira, E.B. et al (1980) J Immunol., 124, 1396). In the purification method of the CRP by the PC - solidified carrier, the purification method is simplified, the mixing in of the impure protein is prevented, the advantage of obtaining the CRP of high purity is possible. However, the production method of the PC - solidified carrier obtained conventionally can produce only a small amount of the final product, a lot of effort is required for several extremely complicated reaction steps which is another problem.

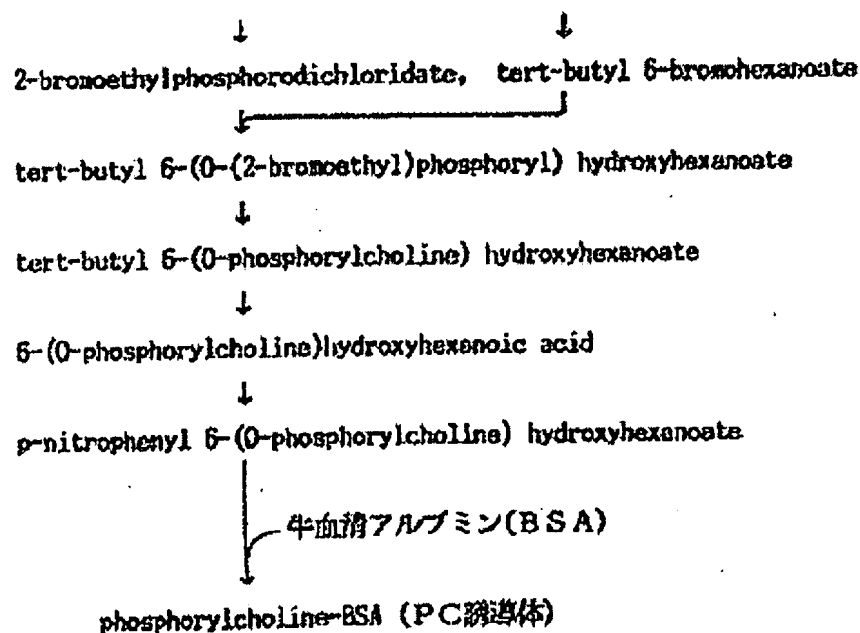
Therefore, the inventors focused their research efforts to resolve the above problems and they discovered a simplified purification method so a highly pure CRP can be obtained by using the affinity chromatography for the PC solidified carrier. The result is a method that can produce a PC - solidified carrier using a commercial substance and reagent, thus, the invention attained success.

(Comparison with the conventional technology)

The production method of the PC - solidified carrier obtained conventionally can produce only a small amount of the final product but a lot of effort is required for several extremely complicated reaction steps. Oliveira E.B. et al production method of the PC - solidified carrier

is the example given below. (furthermore, the arrow means one reaction step)

2-bromoethanol + POCl_3 , isobutylene + 6-bromo hexanoic acid



Bovine blood serum albumin (BSA)...>

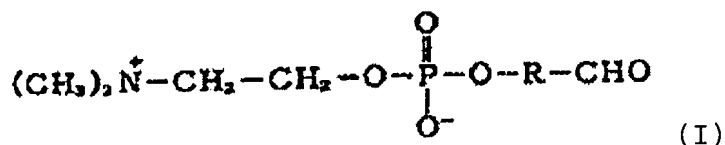
Phosphorylcholine-BSA (PC inductor)

In the above conventional method, a lot of extremely complicated reaction steps are required and it is labor intensive method, the operations are complicated and the yield is low.

However, in the production method of the PC in the invention, the commercial L - glycerol phosphoryl choline that is oxidized with the super iodide, this is only one step called the solidification reduction amino reaction to

the polymer carrier of that product. It is extremely easy to produce and a high yield can be obtained.

The invention pertains to the production method of a new phosphoryl choline inductor that is characterized in that the compound displayed in the next formula (I),



(R in the formula has the structure of carbon in the frame), the polymer compound having the amino group in the molecule goes through the reduction amino reaction.

The compound shown by formula (I) is the precursor compound, that is, the L - glycerol phosphoryl choline, D - diglycerophosphoryl choline, etc can be oxidized with the super iodide easily. /3

Also, the example of the polymer compound having the amino group inside the molecule used in the reaction of the invention is the various types of protein but it is preferred that the commercially sold bovine blood serum albumin is used.

The reaction is preferred to be performed in the reduction amino reaction in the presence of a buffer solution and the compound is shown in formula (I). An example of the reduction agent is the dimethyl amine boron,

cyano hydrogen sodium etc. but the cyano sodium borohydride is generally used. The reaction is heated to 37 deg C for 10 - 30 minutes, the compound of formula (I) in the amino group of the polymer compound is bonded.

After the reaction, it is made clear in water, the unreacted compound of low molecular weight is removed. The liquid in the clear liquid is freeze dried. The phosphoryl choline inductor (PC - inductor) can be obtained with powder.

The PC - inductor synthesized with the production method of the invention is not only simple to produce but the CRP is highly pure and it is used in the purification of the CRP. A fixed amount of CRP can be used.

At present, in the quantitative process of the CRP in the liquid, these methods can be used, for example, the capillary method, the SRID method (the primary immuno dispersion method), the semi quantitative method such as the radix coagulation reaction and the quantitative method such as the immune ratio suspension method, the laser nephelometry method but the immune reaction of the CRP is used. The PC has a bonding force to CRP, it has the special characteristics of predominating the antibody in the CRP, no antibody is present in the CRP. The PC inductor produced with the production method of the invention has similar

property to the CRP, it can be used instead of the antibody in the CRP.

The implementation example of the invention is shown next.

Implementation example 1

Meta super iodide sodium of a pure concentration of 100 mM is dissolved in 52 ml of 50 mM of an aqueous solution of L-glycerophosphoryl choline. By leaving this mixture at room temperature for 30 minutes, a mixed product of choline phosphoryl glycol aldehyde and formaldehyde is obtained. Next, this mixed product is cooled for 2 hours in an ice water bath. Ethylene glycol of same mole amount as the added super iodide is added and dried. The white powder obtained is dissolved in 10 ml of acetic acid of 0.1 M. Gel chromatography is performed with cephadex G-75 (made by Pharmacy Co.) column buffered with 0.1 M acetic acid. The choline phosphoryl glycol aldehyde eluted portion that is verified by the Neocabroin method is collected and made concentrated. The yield obtained is 80% from the L - glycerol phosphoryl choline of the choline phosphoryl glycol aldehyde by quantifying the phosphoric acid remainder inside the molecule.

470 mg of the choline phosphoryl glycol aldehyde obtained from above is dissolved in 70 ml of a solution of

0.2 M phosphoric acid buffer solution of PH of 7.0. In addition, 800 mg of bovine blood serum albumin (BSA) is added. Next, 870 mg of cyano sodium borohydride is added. This is incubated at 37 deg C for 20 hours. After the incubation, the reaction solution is precipitated in water. The liquid inside the precipitation is freeze dried, the PC of average molecule of 24.3 per 1 BSA molecule is bonded and a new PC inductor is obtained.

Implementation example 2

The same operation as Implementation example 1 is performed using the 0.2 M phosphoric acid buffer solution of pH of 7.0, cyano sodium borohydride, the synthesized phosphoryl choline glycol aldehyde similar to the method shown in implementation example 1 and 40 mg of BSA, the various amounts are shown in number 1 - 4 of Table 1./4

Table 1

試薬名 番号	BSA(mg)	ホスホリルコリン グリコアルデヒド (mg)	シアノ水素化ほう 素ナトリウム (mg)	0.2Mリン酸 緩衝液pH7.0 (ml)
1	40	2.02	14.2	3.5
2	40	4.32	14.4	3.5
3	40	67.5	67.7	3.5
4	40	108	90.3	4.1

Column 1: Reagent name/number

Column 3: phosphoryl choline glyco aldehyde (mg)

Column 4: cyano sodium borohydride

Column 5: 0.2 M phosphoric acid buffer solution of pH of
7.0 (ml)

For the new PC inductor produced like above, the PC
molecules being bonded per BSA 1 molecule are 3.9 molecules
for number 1, 7.9 molecules for no. 2, 49.9 molecules for
no. 3 and 56.3 molecules for no. 4.

Agent: Toda, Patent Attorney